

SECRET

SECURITY INFORMATION

CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY
INFORMATION REPORT

25X1A

COUNTRY USSR

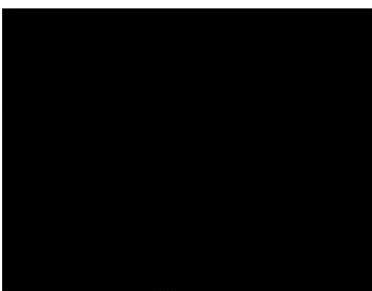
SUBJECT Comments on the work of AA Smorodintsev and O I Shishkina
Dept. of Viruses, Union Institute of Exp. Medicine, Moscow

PLACE ACQUIRED
(BY SOURCE)

25X1A

DATE ACQUIRED
(BY SOURCE)

DATE (OF INFO)



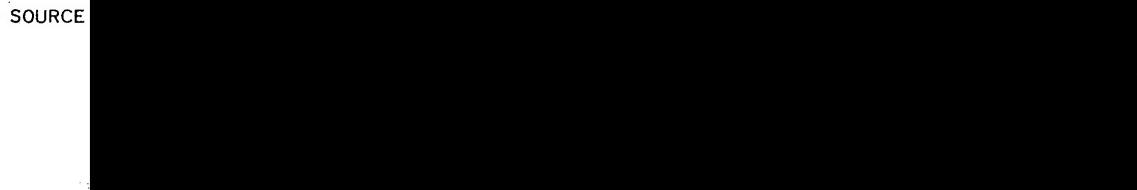
DATE DISTR. 2 SEP 52

NO. OF PAGES 2

NO. OF ENCL.

SUPP. TO
REPORT NO.

25X1X



1. "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum" by A A Smorodintsev and O I Shishkina, Department of Viruses, Union Institute of Experimental Medicine, Moscow. The summary translation of the article states:

"Reactivation of gripe virus from neutral and hyper-neutral mixtures can be accomplished by various methods of isolating the virus from the antibody.

"By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can be isolated only from mixtures which are balanced as far as possible and which contain only a small excess of antibodies.

"A simple method of isolating influenza virus from hyperneutral mixtures is the treatment of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the antibodies have been removed by washing.

"The most exact results, based not only on the isolation, but also on the quantitative characterization of the virus isolated from neutral mixtures, are afforded by the method of adsorption and elution of the virus on the surface of Elford membrane filters and by repeated washing out of the neutral mixtures in ultra-centrifuges.

"The quantitative extent of the reactivation of influenza virus from neutral mixtures with specific serums are not decreased in conditions which increase the intensity of the interaction between virus and antibodies. While removing the virus from the antibodies by washing on Elford filters and in the ultra-centrifuge, the authors observed a high degree of reactivation even after increasing the concentration of antibodies, increasing the temperatures, and lengthening the time of contact."

f
G

U. S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

DISTRIBUTION → STATE ARMY NAVY AIR FBI B/SI E/

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

25X1X

- 2 -

25X1A

2. [REDACTED] the following references are given in the article:

- a) A A SMORODINTSEV and O I SHISHKINA. The role of the humoral factor in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:3, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- b) A A SMORODINSEV and O I SHISHKINA. The role of phagocytic apparatus in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59:20, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- c) TODD C. Brit. J. exper. Pathol., 9, 244, 1928.
- d) BEDSON S.P. Ibid., 9, 235, 1928; 10, 671, 1928.
- e) ANDREWES G H. J. Path. a. Bacter., 31, 671, 1928.
- f) LONG P H. a. P.K. OLITSKY. J. of exper. Med., 51, 209, 1930.
- g) CRAIGIE J. Handb. d. Virusforschung, Bd. 2, 1106, 1939.
- h) MCKINNON N E. J. prevent. Med., 4, 411, 1930.
- i) SABIN A B. Brit. J. exper. Path., 16, 70, 1935; 16, 84, 1935.
- j) MAGRASSI a. HALIAUER, J. Bacteriol., 17, 6, 1936.
- k) MAGILL T P a. FRANCIS T. JR. J. exp. Med., 65, 861, 1937.
- l) BURNET F M, E V KEOGH a. D LUSH. Australian J. exp. Biol., 15, 320, 1937.
- m) TAYLOR R M, J. of Immunol., 40, 373, 1941.
- n) REED L J a. H MUENCH. Am. J. Hyg., 27, 493, 1938.

25X1X

3. [REDACTED] the only thing contained in the foregoing summary which is not of general knowledge is the use of animal charcoal as an adsorbent to isolate the virus from hyperneutral mixtures as a successful method of transmitting infection to mice. The idea itself is not new as various ion exchange resins have been used for the isolation of a specific virus. Also, the use of adsorbent columns, such as aluminum hydroxide gel, are capable of taking some viruses from neutral or hyperneutral mixtures. [REDACTED] animal charcoal has not been used in the US for the purpose described. [REDACTED] nothing of particular value in the way of a new contribution to our present knowledge of biological antagonists.

25X1X
25X1X

On file in FDD is a copy of the original Soviet article entitled "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum."

- end -

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

U. S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY

INFORMATION REPORT

25X1A

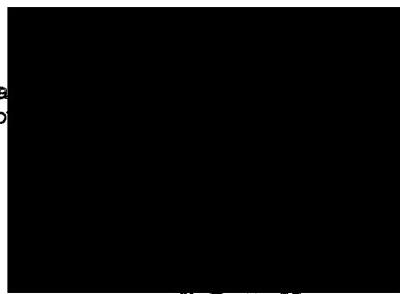
COUNTRY USSR

SUBJECT Comments on the work of AA Smorodintsev and O I Shishkina
Dept. of Viruses, Union Institute of Exp. Medicine, MoscowPLACE ACQUIRE
(BY SOURCE)

25X1A

DATE ACQUIRE
(BY SOURCE)

DATE (OF INF)



DATE DISTR. 2 SEP 52

NO. OF PAGES 2

NO. OF ENCLS.

SUPP. TO
REPORT NO.

25X1X

THIS DOCUMENT CONTAINS INFORMATION AFFECTING THE NATIONAL DEFENSE
OF THE UNITED STATES, WITHIN THE MEANING OF TITLE 18, SECTIONS 793
AND 794, OF THE U.S. CODE, AS AMENDED. ITS TRANSMISSION OR REVE-
LATION OF ITS CONTENTS TO OR RECEIPT BY AN UNAUTHORIZED PERSON IS
PROHIBITED BY LAW. THE REPRODUCTION OF THIS REPORT IS PROHIBITED.

THIS IS UNEVALUATED INFORMATION

SOURCE

25X1X

1. dated 1945 and entitled
"The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum"
by A A Smorodintsev and O I Shishkina, Department of Viruses, Union Institute of
Experimental Medicine, Moscow. The summary translation of the article states:

"Reactivation of gripe virus from neutral and hyper-neutral mixtures can be
accomplished by various methods of isolating the virus from the antibody.

"By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can
be isolated only from mixtures which are balanced as far as possible and which
contain only a small excess of antibodies.

"A simple method of isolating influenza virus from hyperneutral mixtures is the
treatment of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent
intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the
antibodies have been removed by washing.

"The most exact results, based not only on the isolation, but also on the
quantitative characterization of the virus isolated from neutral mixtures, are
afforded by the method of adsorption and elution of the virus on the surface of
Elford membrane filters and by repeated washing out of the neutral mixtures in
ultra-centrifuges.

"The quantitative extent of the reactivation of influenza virus from neutral
mixtures with specific serums are not decreased in conditions which increase
the intensity of the interaction between virus and antibodies. While removing
the virus from the antibodies by washing on Elford filters and in the ultra-
centrifuge, the authors observed a high degree of reactivation even after
increasing the concentration of antibodies, increasing the temperatures, and
lengthening the time of contact."

THIS DOCUMENT HAS AN ENCLOSURE ATTACHED
DO NOT DETACH

U. S. Officials Only

SECRET

SECURITY INFORMATION

DISTRIBUTION →	STATE	X ARMY	X NAVY	X AIR	X FBI	B/SI	EV	
----------------	-------	--------	--------	-------	-------	------	----	--

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

25X1X

- 2 -

25X1A

2. [REDACTED] the following references are given in the article:

- a) A A SMORODINSEV and O I SHISHKINA. The role of the humoral factor in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59a3, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- b) A A SMORODINSEV and O I SHISHKINA. The role of phagocytic apparatus in the mechanism of immunity against influenza. Arch. Biol. Sciences, Bd. 59a20, 1940, Moscow. Arch. f. d. ges. Virusforschung, Bd. 2, 1941.
- c) TODD C. Brit. J. exper. Pathol., 9, 244, 1928.
- d) BEDSON S.P. Ibid., 9, 235, 1928; 10, 671, 1928.
- e) ANDREWES C H. J. Path. a. Bacter., 31, 671, 1928.
- f) LONG P H. a. P.K. OLITSKY. J. of exper. Med., 51, 209, 1930.
- g) CRAIGIE J. Handb. d. Virusforschung, Bd. 2, 1106, 1939.
- h) MCKINNON N E. J. prevent. Med., 4, 411, 1930.
- i) SABIN A B. Brit. J. exper. Path., 16, 70, 1935; 16, 84, 1935.
- j) MAGRASSI a. HALLAUER. J. Bacteriol., 17, 6, 1936.
- k) MAGILL T P a. FRANCIS T. JR. J. exp. Med., 65, 861, 1937.
- l) BURNET F M, E V KROGH a. D LUSH. Australian J. exp. Biol., 15, 320, 1937.
- m) TAYLOR R M, J. of Immunol., 40, 373, 1941.
- n) REED L J a. H MUENCH. Am. J. Hyg., 27, 493, 1938.

25X1X

3. [REDACTED] the only thing contained in the foregoing summary which is not of general knowledge is the use of animal charcoal as an adsorbent to isolate the virus from hyperneutral mixtures as a successful method of transmitting infection to mice. The idea itself is not new as various ion exchange resins have been used for the isolation of a specific virus. Also, the use of adsorbent columns, such as aluminum hydroxide gel, are capable of taking some viruses from neutral or hyperneutral mixtures. [REDACTED] animal charcoal has not been used in the US for the purpose described. [REDACTED] nothing of particular value in the way of a new contribution to our present knowledge of biological antagonists.

25X1X

25X1X

[On file in FDD is a copy of the original Soviet article entitled "The Possibility of Reactivating Influenza Virus from Mixtures with Immune Serum."]

- end -

SECRET/US OFFICIALS ONLY/SECURITY INFORMATION

Influenza

The Possibility of Reactivating ~~Grippe~~ Virus From A Mixture With Immune Serum

A.A. Smorodintsev and O.I. Shishkina
 Dep't of Viruses, ~~All-Union Inst of~~
 Exper Medicine, ~~All-Union Inst of~~

~~influenza hyper-~~
 Reactivation of grippe virus from ~~mixt~~ neutral and ~~grippe~~ neutral mixtures can be
~~isolating Separation~~
 accomplished by various methods of ~~removing~~ the virus from the antibody.

By dilution of the neutral mixture or by cataphoresis, the influenza virus can be
~~isolated~~
~~freed~~ only from ~~mixt~~ mixtures which are ~~as~~ balanced as possible and which contain only a
 small excess of antibodies.

A ~~simplest~~ method of ~~removing~~ influenza virus from hyperneutral mixtures is the
 treatment ~~in contact~~ of the mixture with an animal charcoal suspension, with subsequent ~~intra-~~
 intranasal infection of mice with the animal charcoal suspension from which the antibodies
 have been removed by washing.

The most exact results, based not only on the isolation, but also on the quantitative
~~characteristics~~
~~and so on~~
 characteristics of the virus isolated from neutral mixtures, are afforded by the method of
 adsorption and elution of the virus on the surface of Elford membrane filters, and by re-
 peated washing out of the neutral mixture ~~in super-centrifuges~~.

The quantitative aspects of the reactivation of influenza virus from neutral mixtures
 with specific serums are not decreased in conditions which increase the intensity of the
 interaction between virus and antibodies. While removing the virus from the antibodies by
 washing on Elford filters and in the ~~super-cen~~ rifuge, the authors observed a high degree
~~of reactivation after increasing the concentration of antibodies, increasing the temperature,~~
 and lengthening the time of contact.

BEST COPY
Available

титул. На этом основании *Sabin* сделал заключение об отсутствии прямого взаимодействия между антителами и вирусом и построил парадоксальную теорию о том, что механизм защитного действия антител основан на прямом блокировании чувствительных клеток. *Magnani* и *Hallauer*¹⁰⁾, а также *Craigie*¹¹⁾, приложив ту же методику повторного от积淀а, обнаружили нейтральные смеси вируса гриппа в суперцентрифуге, наблюдавши уменьшение количества вируса на 90-98%.

Вопрос об обратимости связи между вирусом гриппа и нейтрализующими антителами затронут в работе *Majill* и *Francis*¹²⁾! Путем повторного от积淀а нейтральных смесей в суперцентрифуге авторы установили полную инактивацию вируса после 35-минутного контакта с антителами при температуре 37°С. *Burnet*, *Reed* и *Rush*¹³⁾ считывали активность вируса по количеству выдел на хордоаллантоинской оболочке и нашли, что в ранних стадиях взаимодействия вируса с антителами процесс полностью обратим, в поздних же стадиях необратим. *Taylor*¹⁴⁾ показал частичную обратимость вируса гриппа из нейтральных смесей методом последовательных раздilений.

При изучении судьбы гриппозного вируса после контакта с гипериммунной свероткой необходимо разобрать, прежде всего, из большого числа применявшихся методов наиболее чувствительные приемы разделения вируса от антител, обеспечивающие не только выделение общей части вируса, но и определение его количества.

Материал и методика.

Наши исследования проводились со штаммом гриппозного вируса "Ленинград", выделенным в 1936г. и достигшим после многочисленных пассажей на мышах высокой гибельности. Смертельная доза при интравенальном введении соответствовала по 50% пункту латентности по *Reed* и *Muench*¹⁵⁾ 0,008мл³ раздilения 1/6000.000 - 1/20.000.000. Критическая индукционная доза вируса, при которой наблюдается размножение возбудителя в легких, но отсутствует гибель мышей, составляла примерно 1/1000 суперинфекционной дозы. Это гарантировало возможность обнаружения методом последовательных пассажей ничтожных количеств вируса, если-б они сохранили активность после взаимодействия с антителами.

- 3 -

Большая часть опытов проведена с противогриппозной лошадиной сывороткой серии "у", полученной путем гипериммунизации логочным мышным вирусом. На табл. I дано титрование различных разведений этой сыворотки с 3 дозами гриппозного вируса. Нейтрализация нашего вируса требовала, примерно, эквивалентных разведений сыворотки.

При соотпадающих /в абсолютном выражении/ разведениях сыворотки и вируса смеси их были гипернейтральными. Из таких смесей удавалось выделить инактивный вирус, путем пассажей, не прибегая к каким либо специальным приемам разделения вируса от антител.

Табл. I.

Разведение ле-	количество ле-	Разведение сыворотки								разве- дение сыво- ротки, с пол- ной ней- трализацей
		1:10	20	50	100	200	400	800	1600	
гриппозной эмульсии /побозы/	разведения вируса. /инактивной/									
I:2000	5.560	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	1:800
I:200	55.600	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	I:200
I:20	555.000	0/4	0/4	0/3	3/4	4/4	4/4	4/4		I:20

Если сыворотка бралась в 5-10-кратной концентрации по сравнению с разведением вируса, то смесь была полностью нейтрализована и последующие пассажи легких первично зараженных мышей не давали накопления в легких вируса и гибели животных. Гипернейтральной смесью мы называли такое сочетание вируса и антител, при котором избыток антител был > 100 и более раз выше, чем в нейтральной смеси. Для приготовления гипернейтральных смесей С, Icm³ вируса + разведение легчной эмульсии 1:5 добавлялся к 2,2 см³ неразведенной сыворотки. Окончательное разведение вируса в этих условиях соответствует 1:500.

Сравнительная оценка эффективности различных методов разделения вируса от антител..

1. Метод разведения нейтральных смесей.

- 4 -

лась иммуногенным раствором с концентрацией 1:5. Полученные разведения вводились интраназально 4 белым мышам, за которыми осуществлялось наблюдение в течение 10 дней. Выжившие мыши убивались и легкие их повторно вводились свежим мышам /табл.2/.

Табл.2.

Что исследуется.	Вирус 1:100+ сыворотка в разведениях						
	1:20	1:50	1:75	1:100	1:150	1:300	1:600
Исходные смеси вируса и сыворотки	0/6	0/3	0/5	0/3	0/6	2/5	6/6
Пассаж легких перешедших мышей	0/4	0/4	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4
Дополнительные разведения 1:5	0/4	0/4	0/4	4/4	1/4	4/4	4/4
" 1:25	0/4	0/4	0/4	4/4	3/3	4/4	4/4
" 1:125	0/4	0/4	2/4	3/3	3/4	4/4	3/4
" 1:625	0/4	0/4	4/4	4/4	3/4	4/4	-

Обозначения: 2/4 - при непосредств. заражении погибло 2 из 4 мышей в течение 12 дней.

4/4 - на 1 пассаже погибло 4 мыши из 4.

По нашим данным, при помощи метода разведениям удается открыть активный вирус лишь в нейтральных смесях с ничтожным избытком антител. В силу своей малой чувствительности метод разведения, подходит как для открытия активного вируса в нейтральных и особенно в гипернейтральных смесях, так и для количественного учета активного вируса в нейтральных смесях.

2. Метод Электросореза.

Мы пользовались аппаратом Лепнина ёмкостью в 34см³, в ламповым выпрямителем. Применялись неполяризующие электроды системы *Ag-NaCl* и *Cu-CuCl₂*. Регулировка pH производилась десодатными буферами 1/300 - 1/75 моль. Напряжение в сети поддерживалось в пределах 200-280 вольт, а сила тока от 1 до 3,5 ^{мА} миллиампер. Для титрования на присутствие вируса бралась проба ёмкости с анода и с катода.

Исследования В.И.Товарицкого и О.И.Шишкиной показали, что ви-

- 5 -

рус гриппа несет отрицательный заряд по всем зонам своей стабильности /рН=5,2 - 7,6/ и что очистка его от тяжелых белков возможна, если ввести электрорезерв выше рН = 6,0. Нами синтезировались с различно сбалансированными смесями вируса с антигенами.

Надо это было не забыть, потому что приборе "Г" можно было сократить время и открыть его на аноде из биологически нейтральных смесей, в которых имелась весьма небольшая избыточность вируса противующих антигена. При более значительной концентрации, катодорез был способен реагировать вирус.

Как показали исследования контрольных смесей вируса с нормальной липидной сывороткой, подвергнутой 4-часовому электрорезерву, концентрация вируса на аноде выражается сработкой скромными показателями, отличаясь от количества вируса на катоде в 5-10 раз. Усилио этим мы объясняем неудачи обнаружения антигена вируса в нейтральных смесях с большим избытком антигена, которое легко балансирует созданный катодорезом скромный прирост вируса на аноде.

3. Адсорбция на каолин и животный уголь. Реактивация вируса гриппа из биологически нейтральных смесей с помощью избирательной адсорбции на каолин и животный уголь осуществлялась дроблением 5,0 смеси обоих адсорбентов в солевом растворе в форме об"емом 10 миллилитров центрифугированием для обесцвечивания в течение 10 минут и центрифугированием для осаждения разведенных частиц. Осадок промывался два раза в центрифуге 150 см³ солевого раствора, после чего растворялся в раствором антигена для элюирования вируса с поверхности адсорбентов. После центрифугирования отмытих взвесей вновь оставалась пульпа, а также осадок вводились интравазально мышам. /табл.3 и 4/

Адсорбцией на каолин нам удалось обнаружить в виде антигена вирус, если нейтральная смесь имела небольшой избыток антигена. В равных условиях элюаты животного угля были неактивны. Напротив, отмытие осадки обоих адсорбентов, храненные непосредственно в дыхательные пути мышей, обладали значительной активностью.

- 6 -

Табл. 3.

	Гируг 1 : 50 + разводка сыворотки					
	1:10	1:25	1:50	1:75	1:100	1:250
Что исследуется.						
Исходные смеси вируса и сыворотки	0/5	0/4	0/6	1/6	1/5	3/4
Пассаж легких перенесших мышей	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	
После вынужденностного катафореза	0/6	2/5	2/4	4/4	5/6	4/4
который	0/6	0/6	0/6	2/3	1/5	1/5

Табл. 4.

Методы реактивации	Вирус 1 : 500 + разведение сыворотки					
	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	
Исходные смеси	0/6	0/6	0/4	0/6	3/3	4/6
Катафореза	0/3	0/6	0/5	3/3	2/5	3/6
Полупротивные разведения 1:4-1:256	0/4	0/4	4/6	6/6	3/6	4/4
Адсорбции на силиконом масляном	0/4	2/4	3/3	4/4	4/4	3/3
Адсорбции на олином масложи	0/6	5/5	4/4	5/5	6/6	5/5
Адсорбции на гидроуглем масложи	0/4	0/4	0/5	4/4	4/4	3/3
Адсорбции на гидроуглем масложи	5/5	5/5	4/4	4/4	5/5	5/5

(Сообщения см. табл. 2).

Особенно ценным приемом реактивации вируса является из нейтральных смесей оказалось адсорбция на жиротный уголь. По разработанному вами методу необходимо засратать мышей развесью частиц гидротного угля, ~~в количестве~~ стеклянной горелке (на горелке пластилине) от избытка антител сульфоном или раствором Ингерта.

Как видно из табл. 4 адсорбция на жиротный уголь ~~имеет~~ очень значительно успешнее реагирует вирус из нейтральных смесей, чем катажрез или метод разведения. Таким залогом успеха является присутствие в нейтральной или в гипернейтральной смеси большого количества вируса - путем адсорбции на уголье удастся обеслу-

- 7 -

тирате не более 1/200 - 1/1000 исходной массы вируса дает из смесей вируса с нормальной сывороткой. При малом содержании вируса в смеси метод адсорбции на уголь дает отрицательные результаты, что объясняется, по-видимому, неполной адсорбции вируса из исходной смеси, а также сложной эпидемии вируса Гриппа с частичным вирусным ущербом в определенных клетках. /Табл.5/.

Табл.5.

Что обследуется.	Четвертная эмульсия вируса гриппа в разведениях.					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Смесь с нормальной сывороткой /1:5/					4/4	4/4
Смесь с иммун. сывороткой /1:5/					4/5	2/5
Эпид. виро-угля из нейтральной смеси					0/4	0/4
Отметный осадок эпид. угля из нейтральной смеси					0/4	0/4
Стыртый осадок эпид. угля из смеси с нормальной сывороткой.					0/3	0/3

По наблюдениям нашей лаборатории /О.С.Бах/ метод адсорбции на уголь обнаружен полезен для выделения из нейтральных смесей пульчевших вирусов, например, гриппового вируса гриппа, если эти смеси содержат большое количество используемого вируса.

4. Реактагация вируса гриппа из нейтральных смесей различным

фильтрами на сильноградиентных фильтрах Эльборда и в суперцентрифуге.

Мы пользовались мембранными фильтрами различной пористости, приготовленными в лаборатории проф. В.И.Тогаринского по методу Эльборда. Первые опыты были поставлены со смесями вируса гриппа с нормальной лошадиной сывороткой. Мембрани с диаметром пор более 200μ оказались непротоклимы, так как пропускали значительную часть вируса в фильтрат и давали поэтому слабоактивные эпидемии. При диаметре пор между 100-200 μ активность фильтратов резко понижалась, а содержание вируса в слизиах достигало наибольших цифр. Большая часть опытов проведена с фильтрами

- 8 -

с диаметром пор в 125-175 μ , оставляясь в аппарате Зейтца. Эти фильтры задерживали значительную часть вируса и позволяли прородить фильтрацию достаточно быстро.

Для удаления сыворотки через фильтр пропускался 3-6 раз раствор Рингера или разведенный 1:5 бульон /5 см³ на каждое промывание/, после чего фильтр вынимался из аппарата Зейтца, тщательно растирался с кварцевым песком в ступке с 3 см³ 1/300 раствора аммиака, для ослабления связей между веществом фильтра и вирусом.

После легкого центрифугирования элюат освобождался от вещества фильтра и обследовался титрованием на мышах.

Другим приемом механического разделения вируса гриппа от антител служило в новых опытах суперцентрифугование в горизонтальной центрифуге Экко при 13.000 оборотах в минуту. После 2-часового центрифугирования выстоявшая жидкость удалялась и к осадку добавлялось 20 см³ фарбулерного раствора. Для наибольшего освобождения от посторонних веществ эта процедура повторялась 3 раза. Отмытый осадок доводился до 3 см³ и титровался на мышах.

В предварительных опытах был изучен предел выживаемости вируса гриппа из смесей с нормальной лошадиной сывороткой, при помощи элюирования с фильтров Эльфорда и суперцентрифугирования. Нормальная лошадиная сыворотка в разведении 1:5 смешивалась с различными об"емами вируса 1:20, 1:2000, 1:200.000/ /табл.6/.

Количество смертельных мышьных доз в исходном вирусе составляло $8 \cdot 10^6$. Титр того же вируса после фильтрования через мембранные фильтры, промывания от сыворотки и элюирования упал до $2.75 \cdot 10^5$, после отмыкания осадка в суперцентрифуге до $1.13 \cdot 10^6$.

Таким образом, работая со смесью вируса с нормальной сывороткой удавалось сохранить после промывания на поверхности мембранных фильтров около 5% исходной массы вируса, в осадках после отмыкания в суперцентрифуге до 20% исходного вируса. Эти методы оказались весьма ценными для разделения вируса от антител в нейтральных смесях.

Легочная эмульсия вируса в разведении 1:500 прородилась в продол-

- 9 -

Табл. 6.

Чувствительность методов элюирования с мембранных фильтров и суперцентрифугирования / вирус в смеси с нормальной сывороткой/.
50% + исходного вируса = I:8.000.000

Количество ВИЧ вируса в смеси с нормальной сывороткой.	Конечное разведение элюатор или осадков									
	Элюаты					Осадки в суперцентрифуге				
I:40тыс./200тыс./I милли/5милл.	50% /40т./200т./I милли/5милл/50%									
400.000	3/4	4/5	1/5	0/5	370	4/4	5/5	3/5	1/5	I милли
4.000	4/4	2/5	0/5	0/5	155	4/4	4/4	1/4	0/5	590 тыс.
40		2/5	1/5	0/5	200		4/5	4/5	1/5	I милли 800 тыс.
Средний по- казатель для 50%+					275					I милли 130 тыс.

жительный контакт с лошадиной иммунсывороткой в разведении I:2, I:20 и I:400. Контролем служила смесь той же дозы вируса с нормальной лошадиной сывороткой I:2, которая подверглась одновременному изучению методом разделения на фильтрах и в суперцентрифуге. Нейтральные и контрольные смеси фильтровались через мембранные Эльфорда в 175 микрометров и освобождались от сыворотки 6-кратным отмыванием фосфатно-буферным раствором /общий объем промывной жидкости 30-60 см³/.

Протекочные опыты показали, что столь интенсивное промывание фильтров хорошо удаляет антитела и резко понижает вируснейтрализующие свойства элюаторов. Если ограничиться 2-4 кратной промывкой фильтра /по 5 см³ буферного раствора на каждое промывание/, то элюаты /после 30 мин. прогревания при 55°C для освобождения от вируса/ способны нейтрализовать небольшие дозы вируса, чем резко нарушается точность исследования. Разделение вируса от антител в суперцентрифуге достиглось трехкратным промыванием осадка вируса фосфатно-буферным раствором /по ~0 см³ на каждое промывание/.

- 10 -

Как это видно из табл.6, методы отмывания нейтральной смеси на поверхности мембранных фильтров Эльфорда или в суперцентрифуге оказались наиболее чувствительными приемами разделения вируса от антител и обнаружения активного вируса в гипернейтральной смеси. Особенной ценностью этих методов реактивации является возможность точного количественного учета вируса, сохранившего свою активность после контакта с антителами.

Метод суперцентрифугирования оказался более точным, но и более громоздким приемом, чем отмывание на фильтрах Эльфорда. Последний и был широко использован нами для анализа различных сторон реакции нейтральной смеси.

Табл.7.

Метод реакции	Вирус I:50 + № 1:2				Вирус I:50 + № 5 I:2			
	Неполные разведения				Нормальные			
Несразвед.	I:20	I:400	I:8 I:160	Несразвед.	I:20	I:400	I:8 I:160	Несразвед.
Суперцентрифугирование	4/4	4/4	3/4	2/4 0/4	4/4	4/4	4/4	4/4 0/4
Омыление с фильтрами Эльфорда	4/4	4/4	3/4	0/4 0/4	4/4	3/3	4/4	2/4 0/4
Исх. смеси	0/4	0/4	0/4				4/4 4/5	4/5

5. Влияние концентрации иммунсывороток на активность гриппозного ви- руса.

Вирус гриппа /эмulsionия легких белых мышей в разведении I:500/ соединялся с различными концентрациями лошадиной иммунсыворотки /I:2, I:40, I:400/, а также с нормальной лошадиной сывороткой I:2. После 20-часового контакта /2ч. при 37°С и 18 час. при 2°С/ нейтральная смесь отмывалась на фильтрах Эльфорда /6 раз по 5 см³ жидкости/, а также в суперцентрифуге. Пробирка исходных нейтральных смесей заражением мышей и повторными пассажами установила неактивность смесей даже при разведении сыворотки I:400.

- II -

Количественное обследование элюатов с фильтров Эльборда, а также осадков после суперцентрифугирования показало возможность далеко идущей реактивации вируса из гиперцентрализованных смесей /табл.8/.

Табл.8.

Сыворотка	Разредение сыворотки	Зарождение сеяния	Контроль исходных смесей		Элюаты с фильтров Эльборда в разведениях					
			1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	50%	
Иммунная	I:2	0/3	0/3	0/3	6/6	6/6	4/6	2/5	0/6	339
"	I:20	0/3	0/3	0/3	6/6	6/6	5/6	1/6	0/3	317
"	I:400	0/3	3/3		6/6	6/6	4/5	3/6	0/5	777
Нормальная	I:2	0/3			5/5	5/5	4/5	3/6	0/5	2200

Путем отмыкания вируса от антител на фильтрах Эльборда в смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой обнаружено 2200 смертельных доз, в смеси с иммунсыворотками I:400-777, I:40-317, I:2-339 смертельных доз /по 50% пункту летальности/ вычисленному по Reed и Манен. Методом отмыкания в суперцентрифуге мы имели соответственно 2200 ~~длн~~ в контроле, 4250, 4 000, 4 800 ~~длн~~ в опытных смесях.

Мы обнаружили, таким образом, до 20% исходной массы вируса после суточного контакта его с антителами. При этом оказалось, что различия в концентрации антител не отражаются на количественной стороне реактивации. Путем интенсивного отмыкания от антител удалось восстановить значительный % вируса, находившегося в центральной смеси, независимо от титра антител. Повторяя эти опыты, мы наблюдали изредка менее отчетливую реактивацию из гиперцентрализованных смесей, причина чего было тогда неполное удаление антител с фильтров или из осадка в суперцентрифуге. В этих случаях контроль соответствующих элюатов или отмытого осадка, прогретых 1/2 часа при 56°С /для инактивации вируса/ устанавливали нейтрализующие свойства такого материала.

Если-б нейтрализующие антитела вызвали необратимую инактивацию вируса, этот процесс усиливался бы в своей интенсивности при повышении температуры или увеличении продолжительности /для инактивации/. Наши ис-

- 12 -

следования не подтвердили, однако, такого предположения.

0,1см³ гриппозного вируса в разведении I:5 соединялся с 9,9см³ неразведенной иммунсыворотки и выдерживался 2 часа при $\text{t} = 0^{\circ}, 21^{\circ}$ и 37°C , после чего отмывался от антител на фильтрах Эльборда пористостью $\mu 150$ в также в суперцентрифуге. Смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой, выдержаные в тех же условиях, служили контролем /табл. 9/.

Элюаты гипернейтральной смеси, а также промывные осадки после суперцентрифугации обнаружили присутствие актичного вируса, количество которого прогрессивно уменьшалось по мере возрастания температуры контакта. Однако, оказалось, что более значительная гибель вируса при 21° и 37°C наблюдалась не только в нейтральных смесях, но и после взаимодействия вируса с нормальной сывороткой. За 2 часа экспозиции вируса при этих температурах терялось до 90% исходной активности не только в нейтральных, но и в контрольных смесях. Глажко отметить, что в этих температурных условиях нам удавалось реактивировать из нейтральных смесей до 50% вируса по сравнению с контролем, причем повышение температуры до 37° не вызывало более интенсивной инактивации, чем при температуре $= 20^{\circ}\text{C}$.

Табл. 9.

Влияние 1° контакта на прочность связи А.										
	Сырье			Сырье в разведениях			Осадок с центрифугой			разведение
0	Иммун.	4/6	3/6	4/6	1/3	517000	3/6	3/3	1/3	0/3
0	Норм.	6/6	6/6	4/6	0/6	437000	6/6	6/6	5/6	1/3
21°	Иммун.	5/6	2/6	0/6	0/3	10.000	6/6	6/6	2/4	0/6
21°	Норм.	4/6	6/6	0/6	0/2	53.800	6/6	6/6	3/6	0/3
37°	Иммун.	4/6	2/6	0/5	0/3	7.770	5/5	2/6	0/5	0/6
37°	Норм.	4/6	4/6	0/4	0/3	13.900	6/0	4/6	0/5	0/4
										43.790

На таблице № 10 даны результаты двух опытов, выяснивших влияние длительности контакта на судьбу вируса гриппа в гипернейтрализованных смесях. В этих опытах 0.1см³ вируса в разведении I:5 было соединено с 9,9см³ неразведенной иммунсыворотки или нормальной лошадиной сыворотки. После контакта, длительность которого колебалась от 15 мин. до 72 час.

- 13 -

/при температуре в 18-20°С/ нейтральные и контрольные смеси реагировались на фильтрах Фильсфорда. Исходные нейтральные смеси не обнаружили присутствия активного вируса при биологическом контроле на мышах с двукратными пассажами. Контрольные смеси вируса с нормальной лошадиной сывороткой содержали 225.000 смертельных доз = 0,05 см³. Ч в этих опытах не удалось обнаружить влияния длительности контакта с антителами на степень инактивации вируса гриппа: реакция вируса из нейтральных смесей осуществлялась одинаково полно как после короткого, так и после длительного взаимодействия. Как и следовало ожидать, вирус

табл. 10.

Оудьба вируса гриппа при взаимодействии с иммунной сывороткой

Сроки кон- такта	об- ру- щаса с сыво- рот- кой	Газведение элюатов, полученных из смеси вируса с сывороткой.				1-й опыт		2-й опыт	
		Мсх. /:25 /:625 /:15.625	с раз- веде- нием 50%	Мсх. /:25 /:625 /:15.625	с раз- веде- нием 50%				
5мин.	инактивал	4/6	4/6	2/6	2/6	121	4/5 4/5	2/6	1/5 180
	нормализал	5/6	3/6	4/6	0/6	160	2/3 1/4	5/6	0/5 1600
30мин.	инактивал	6/6	5/6	3/5	1/6	1090	5/3 3/6	1/5	0/5 42
	нормализал	5/5	5/6	2/6	0/6	192	3/3 5/6	1/6	1/5 123
2часа	инактивал	5/6	3/6	0/6	1/2	25	6/6 2/6	2/6	325
	нормализал	6/6	5/6	0/6	0/5	91	2/5 1/4	5/6	325
4часа	инактивал	6/6	6/6	3/6		625	5/5 2/6	0/5	275
	нормализал	6/6	4/5	1/6	1/5	1360	6/6 3/6	0/5	325
24час.	инактивал	6/6	6/6	1/6		170	4/5 1/6	2/6	9
	нормализал	1/4	1/6	1/6	0/4	625	1/4 2/5	1/6	25
48час.	инактивал	2/5	0/5			1	0/0 1/0	0/0	7
	нормализал	3/6	1/6			1.5	3/3 6/6	0/0	25
72час.	инактивал	0/5				1	0/5 1/6	0/5	1
	нормализал	2/5				1	0/5 2/6	0/5	1
Сред- ние цифры		инактивал				388			189
указанные		нормализал				485			453
иммун. сыв.									

- 14 -

гриппа потерял значительную часть своей активности после продолжительного пребывания в условиях комнатной температуры, причем этот процесс протекал одновременно интенсивно не только в нейтральных, но и в контрольных смесях.

Наши исследования показали возможность далеко идущей рекомбинации вируса гриппа из нейтральных смесей, количественная сторона которой не зависит от концентрации антител, гибкости температуры и продолжительности контакта. Это дает основание отрицать наличие необратимого разрушения /лизиса/ вируса гриппа после длительного взаимодействия с избытком антител.

Как это видно из приведенных таблиц, концентрация реактивированного вируса из нейтральных смесей почти во всех опытах уступает количеству вируса из смесей с нормальными сыворотками. По всем данным причиной тому является более интенсивная инактивация вируса при контакте с антителами, поскольку ^{прочим} инактивированного вируса не возрастает под влиянием повышенных доз антител или увеличения времени и температуры контакта. Более правильно ~~объясняет~~ получение ^{прочим} недостаточным совершенством применявшихся методов удаления антител, адсорбированных вирусом. Небольшая часть антител остается все же связанный с вирусом, даже после интенсивного отмытия на фильтре или в суперцентрифуге. Этот факт может обуслаждить частичную инактивацию вируса, как это и наблюдалось в приведенных выше опытах. В пользу такого предположения говорит ^{прочим} возрастание ^{прочим} вируса по мере усиления интенсивности промывания.

Второй вероятной причиной, об'ясняющей уменьшение количества вируса в нейтральных смесях, является агрегация /агглютинация/ частиц вируса гриппа после контакта с антителами. Помимо спонтанной микротехнологии элементарных телец, в нейтральной смеси имеются также крупные агрегаты, обусловленные преципитацией белков мышечных легких специфическими преципитинами, образующимися при иммунизации пошадей легочными вирусом белых мышей. Этим об'ясняется, по-видимому, и заблокированная фильтруемость через мембранные фильтры сльюма нейтральных смесей по

- 15 -

срагнению с контрольными смесями вируса и нормальной сыворотки. В процессе формирования преципитатов сыворотки они увлекают за собой и частицы вируса. Совершенно ясно, что реактивация вируса нарушает точность данной пробы, снижает точность количественного учета при титровании вируса методом последовательных разведений отдельными нипостами.

Правильность такого истолковения причин частичной инактивации вируса в нейтральной смеси иллюстрирует опыт. /табл. II/.

Табл. II.

Чис- ло отмы- ваний	Антисыворотка лошади для легочного вируса					Антисыворотка кролика для хорошаллантоинской жидкости						
	I/2	I/40	I/800	I/16т. 50%	к на фильт- ре.	I/2	I/40	I/800	I/16т. 50%	к кон- тро- лю		
2	5/5	0/5	0/5	9	0,5	3/5	0/4	0/5	0/5	4	0,25	
5	4/4	1/5	2/5	0/4	30	2.2	4/4	3/4	2/5	0/5	290	21
8	5/5	4/5	0/5	1/5	170	64	4/5	4/5	2/4	0/4	240	90
12	5/5	2/4	1/5	0/4	72	27	5/5	3/5	1/5	0/4	100	48

Число отмы- ваний	Нормальная кроличья сыворотка .				
	I/2	I/40	I/800	I/16т. 50%	к на фильт- ре.
2	5/5	3/5	4/4	0/5	1700
5	3/4	5/5	3/5	1/5	1350
8	4/4	4/4	1/5	0/5	265
12	4/5	4/5	2/5	0/5	205

Суспенсия легких белых мышей, в разведении I:250, с сднялась с двухя протигриппозными сыворотками. Первая сыворотка была получена путем гипериммунизации лошадей легочным вирусом гриппа вторая сыворотка приготовлена путем гипериммунизации

кроликов хорошаллантоинским вирусом. Титр вируснейтрализующих антител лошадиной сыворотки превосходит в 8 раз титр кроличьей сыворотки, что было учтено при изготовлении нейтральных смесей. После получасового контакта при $T = 24^{\circ}\text{C}$ обе гипернейтральные смеси разделялись на фильтрах Эльфорда промыванием буферным раствором Рингера /рН-7,8/. Количество промываний было различно, причем на каждое промывание расходовалось 5 см³ жидкости. Мы видим, что по мере усиле-

- 16 -

ния процесса отмытия антител \neq реактивированного вируса возрастает, достигая после 8 отмываний 64-90% количества вируса в контрольной смеси /вирус с нормальной кроличьей сывороткой/. При этом, реактивация вируса оказалась менее полной в смеси с лошадиной сывороткой, нежели с кроличьей. Возможно, что причиной тому служило образование пренципита при взаимодействии белков мышечных истин и специфических пренципитатов лошадиной сыворотки. Дальнейшие промывания вируса на фильтрах ~~же~~ вели к уменьшению исходной активности. Наличие далеко идущей реактивации вируса из нейтральных смесей не дает оснований сомневаться в прямом взаимодействии между вирусом и смешанными антителами. Частичи вируса вполне регулярно адсорбируются эти антитела. Следует, создавшийся комплекс не обладает большой прочностью и может быть легко нарушен искусственными приемами.

Краткие итоги работы. Полная реактивация вирусов после взаимодействия со специфическими сыворотками представлялась прежним авторам убедительным доказательством вирулентного действия антител. Однако скрупулезное показана возможность восстановления активности вирусов гриппа, куриной чумы, герпеса и т.д. путем простого разведения нейтральных смесей в физиологическом растворе, суперцентрифугирования или адсорбции. Одна и та же смесь вируса с антителами может быть то неактивной, то снова стать инфициционной при изменении способа заражения животных, обладающих различной чувствительностью к различным способам заражения. Возможность реактивации вируса гриппа из нейтральных смесей с сыворотками решена ~~еще~~ строго только одними авторами и положительно другими.

Нами исследованы установили регулирующую реактивацию вируса гриппа из гипопротеиновых смесей, степень которой зависит от содержания нейтральной сыворотки. Наиболее точные результаты, которые позволяют количественного учета реагируемых вируса, мы получили после отмытия вируса от антител в суперцентрифуге или на поверхности мембранных фильтров.

В настоящей работе был подвергнут анализу процесс реактивации ви-

вируса из нейтральных смесей — устойчив к гипероксистатии вируса с антигенами путем увеличения концентрации антител, полученных температурой и удалившимися антигенами коньюнктуры. Количественная защита против инфекции характеризовалась достаточно высокими показателями для при подборе оптимальных условий для размножения антител на вирусе, факт размножения антигенного продукта исходного вируса из гипероксистральных смесей дает основание сомневаться в существовании необратимого лизиса между антигенами и вирусом гриппа, поскольку в размноженного вируса не зависит от концентрации суперстрота, времени и температуры контакта.

Summary:

1. Реакция вируса гриппа на нейтральные и гипероксистральные смеси может быть осуществлена при помощи расщепляемых пленок разделения вируса от антител.

2. Методом разведения нейтральных смесей или путем катарореза удается освободить вирус гриппа лишь из точно сбалансированных смесей, в которых избыток антител неделим.

3. Простым способом разделения вируса гриппа из гипероксистральных смесей является обработка ватсы хлесткого угла с последующим интенсивным зажарением в чистой суспензионной угле, очищенного от антител.

4. Помимо таких результатов, основанных не только на разделении, но и на количественной характеристики скоординированного из нейтральных смесей вируса, обеспечивается метод адсорбции и элиминации вируса на поверхности мембранных фильтров Сильвера, в течении которого отмечание нейтральных смесей в суперструктуре.

Количественная защита реакции вируса гриппа из нейтральных смесей со сплошными суперструктурами не уменьшается в условиях, позволяющих сохранять взаимодействие вируса с антигенами. Отмечен вирус от антител не фильтрах Сильвера и в суперструктуре, авторы избегали высокую степень очистки после уменьшения концентрации антител, понижения температуры и удалившись времени контакта.